

09/254,870



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, C07K 14/82, A61K 31/70,</b> <b>C12N 7/01 // 15/86</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 95/09916</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 13 avril 1995 (13.04.95)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR94/01142 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 29 septembre 1994 (29.09.94)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 93/11774                      4 octobre 1993 (04.10.93)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seule- ):</b> MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). REVAH, Frédéric [TN/FR]; Bâtiment Flamme 2, 49, rue de Châtenay, F-92160 Antony (FR). STUTZMANN, Jean-Marie [FR/FR]; 9, rue de l'Arche, F-94440 Villecresnes (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FL, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND UTILIZATION THEREOF PARTICULARLY FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES  <b>(54) Titre:</b> COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET LEUR UTILISATION, NOTAMMENT POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES NEURODEGENERATIVES  <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to the utilization of compounds capable of inhibiting the activity of the proteine p53 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of neurodegenerative diseases.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne l'utilisation de composés capables d'inhiber l'activité de la protéine p53 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET LEUR UTILISATION.  
NOTAMMENT POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES  
NEURODEGENERATIVES

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques et leur utilisation, notamment pour le traitement des maladies neurodégénératives. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation de composés agissant sur la protéine p53 ou sur son gène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives.

Le gène p53 code pour une protéine nucléaire de 53 kDa. Le gène sauvage codant pour la p53 native possède une activité anti-oncogène [pour revue, voir par exemple Oren, FASEB J. 6 (1992) 3169]. En particulier, la protéine p53 sauvage est capable d'inhiber la formation des foyers de transformation dans des fibroblastes de rongeurs transfectés avec diverses combinaisons d'oncogènes. La forme mutée par délétion et/ou mutation de ce gène est au contraire impliquée dans le développement de la plupart des cancers humains [Baker et coll., Science 244 (1989) 217]. Ses formes mutées sont également capables de coopérer avec les oncogènes ras pour transformer des fibroblastes murins. Pour cette raison, la protéine p53 ou son gène ont été largement étudiés en tant que cibles pour le traitement des cancers. Par ailleurs, Chopp et al. (Biochem.Biophys.Res.Com 182 (1992) 1201) ont décrit une expression de p53 dans le cerveau de rat ischémié. Cependant, rien n'indique dans ces résultats si cette expression constitue une cause de la neurodégénérescence, ou un phénomène parallèle. De plus, aucune approche thérapeutique n'est envisagée ni suggérée dans ce document.

La présente invention résulte en partie de la mise en évidence que la protéine p53 constitue un médiateur de la dégénérescence neuronale. Elle résulte également de la mise en évidence que l'emploi de composés capables d'inhiber au moins partiellement l'activité de la protéine p53 peut permettre de bloquer le processus de mort neuronale.

Pour étudier les mécanismes moléculaires de la dégénérescence neuronale, la demanderesse a utilisé comme modèle des souris chez lesquelles l'expression du gène p53 a été inactivée [Donehower et al., Nature 356 (1992) 215]. Des expériences d'ischémie focale irréversible ont été pratiquées sur ces souris, et les volumes d'infarct ont été comparées avec celles observées chez des souris sauvages contrôle (même souche, même sexe, même âge, même fournisseur). Les résultats obtenus ont montré

une diminution statistiquement significative de 20 % des volumes d'infarct après ischémie des souris n'exprimant pas le gène p53 (Cf exemples). De plus, la demanderesse a également démontré que l'utilisation d'antisens anti-p53 permet de ralentir la mort induite par le glutamate sur des cultures de cellules corticales. Ces  
5 résultats démontrent que la protéine p53 joue un rôle de médiateur de la dégénérescence neuronale, observation qui n'a jamais été rapportée dans l'art antérieur, et qu'un contrôle de l'activité de cette protéine permet de lutter contre la mort neuronale. La protéine p53, son gène et l'ensemble des facteurs susceptibles d'interagir avec elle constituent donc de nouvelles cibles pharmacologiques dans le traitement des  
10 processus neurodégénératifs. L'invention réside donc en partie dans l'utilisation de composés capables de bloquer au moins partiellement l'activité de p53 pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Un premier objet de la présente invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibant au moins partiellement l'activité de la protéine p53 pour la  
15 préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

Les composés inhibant au moins partiellement l'activité de la protéine p53 au sens de la présente invention peuvent être des composés agissant (i) sur la synthèse de p53, aux niveaux transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel, ou (ii) sur la  
20 liaison de p53 à l'ADN.

Parmi les composés agissant sur la synthèse de la protéine p53, on peut citer les séquences nucléotidiques antisens capable de réduire ou de supprimer l'expression de p53, au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

De telles séquences peuvent en effet être dirigées contre l'ARNm de p53 et  
25 agir sur la traduction de celui-ci en protéine : il peut s'agir d'oligonucléotides (synthétiques, modifiés chimiquement, etc tels que décrits par exemple dans les demandes EP 092 574, EP 231 495, WO 92/03568; WO 91/13080, etc) ou de séquences d'ADN codant pour des ARN capables d'interagir sélectivement avec l'ARNm de p53, selon la technique décrite par exemple dans la demande EP 140 308.

30 De telles séquences peuvent également être dirigées contre le gène codant pour p53 et agir sur la transcription de celui-ci en ARN. Plus particulièrement, ces séquences peuvent être dirigées contre des régions codantes du gène (gène de structure de p53), ou contre des régions non codantes : régions régulatrices de la transcription, exons, etc. De telles séquences peuvent être préparées dans les

conditions décrites par exemple dans EP 558 634, WO 91/06626, WO92/10590, WO 93/10820, etc).

Parmi les composés agissant sur la liaison de p53 à l'ADN, on peut citer plus particulièrement des antagonistes de p53, ou des protéines capables d'interagir avec p53 et de moduler ainsi son activité de liaison à l'ADN. A cet égard, on peut citer les mutants dominants négatifs de p53 constitués essentiellement de forme mutée inactive, qui sont capables d'entrer en compétition avec la protéine sauvage pour l'interaction avec l'ADN. De tels mutants sont par exemple le mutant p53Val135, ou d'autres formes décrites par exemple dans Michalovitz et al. [J. Cell. Bioch. 45 (1991) 22]. Ils peuvent être utilisés tels quels, mais, préférentiellement, ils sont utilisés dans le cadre de la présente invention sous forme de constructions génétiques capables d'exprimer in vivo ces mutants. D'autres composés capables d'inhiber au moins partiellement la liaison de p53 à l'ADN sont constitués par des acides nucléiques double brin reproduisant le site de liaison de p53 à l'ADN [El-Deiry et al., Nature 1 (1992) 45 ; Kern et al., Science 252, 1708 ; Friedman et al., PNAS 90 (1993) 3319]. La demanderesse a en effet montré que de tels acides nucléiques étaient capables de complexer les facteurs de transcription présents dans les cellules, de les empêcher de se fixer sur leurs sites endogènes, et ainsi, de bloquer leur activité transcriptionnelle.

Dans un mode préféré, le composé utilisé dans le cadre de la présente invention est un acide nucléique double brin comprenant tout ou partie du site de liaison de p53 à l'ADN. Plus préférentiellement, l'acide nucléique comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou un variant actif de celle-ci. Le terme variant actif désigne au sens de l'invention tout variant de la séquence SEQ ID n° 2 ayant conservé les propriétés de fixation à la protéine p53. De tels variants peuvent être obtenus par mutation, délétion, substitution et/ou addition de bases sur la séquence SEQ ID n° 2, puis vérification in vitro de l'activité de liaison.

Dans un autre mode préféré, le composé utilisé dans le cadre de la présente invention est un acide nucléique codant pour une forme mutée de la protéine p53 capable d'antagoniser l'activité de celle-ci.

Toujours dans un mode préféré, le composé utilisé dans le cadre de la présente invention est un acide nucléique antisens capable de réduire les niveaux d'expression de la protéine p53, au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Plus préférentiellement, il s'agit d'un ADN codant pour un acide ribonucléique antisens

capable d'inhiber la traduction de l'ARNm cellulaire de p53. Un tel antisens est représenté sur la séquence SEQ ID n° 1.

L'acide nucléique peut être utilisé tel quel, par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour induire une protection ou traiter la dégénérescence neuronale. En particulier, il peut être injecté sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Il peut également être administré sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran [Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891], avec des protéines nucléaires [Kaneda et al., Science 243 (1989) 375], avec des lipides [Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413], sous forme de liposomes [Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431], etc.

Préférentiellement, l'acide nucléique utilisé dans le cadre de l'invention fait partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites cellules, ce qui permet d'obtenir un effet inhibiteur durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origines diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules nerveuses humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV), le virus de l'herpès, etc.

A cet égard, la présente invention a également pour objet tout virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour une forme mutée de la protéine p53 capable d'antagoniser l'activité de celle-ci, et/ou un acide nucléique comprenant tout ou partie du site de liaison de p53 à l'ADN et/ou un acide nucléique antisens capable de réduire les niveaux d'expression de la protéine p53, au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

Le virus recombinant selon l'invention peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés, etc. De préférence, il s'agit d'un virus capable d'infecter les cellules nerveuses, tel que notamment un adénovirus. Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature [Akli et al., Nature

Genetics 3 (1993) 224 ; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241 ; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Le Gal la Salle et al., Science 259 (1993) 988 ; Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211 ; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353 ; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739 ; Miyanochara et al.,  
5 New Biol. 4 (1992) 238; WO91/18088].

Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit  
10 virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par l'acide nucléique. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

15 Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus recombinant défectif.

Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas  
20 dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réplication sont les régions E1A et E1B.

25 Un mode de réalisation particulier de l'invention consiste dans un vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux acides nucléiques tels que définis ci-dessus.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la  
30 séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant [Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917]. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie

du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 [Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59] qui contient  
5 notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP [Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460].

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les  
10 techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant tel que défini ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intra-  
15 veineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels),  
20 stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'acides nucléiques (séquence ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et  
25 notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, de l'acide nucléique à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au  
30 pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plaques de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.



De telles compositions pharmaceutiques peuvent être utilisées chez l'homme, pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives, et en particulier, pour le traitement et/ou la prévention de la dégénérescence neuronale associée à l'ischémie, l'hypoxie, l'anoxie, l'hypoglycémie, les attaques épileptiques ou encore les traumatismes cérébraux ou spinaux, ou pour le traitement et/ou la prévention de la chorée de Huntington, de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson ou de la sclérose latérale amyotrophique.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

## 10 Légende des figures

Figure 1 : Inhibition de la mort cellulaire induite par le glutamate sur des cultures primaires de neurones corticaux par un acide nucléique antisens anti-p53.

### Techniques générales de clonage

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence

de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

## 15 EXEMPLES

Exemple 1 : Diminution du volume d'infarct chez les souris ischémiées par suppression du gène p53.

Cet exemple décrit l'effet de la suppression du gène p53 sur le volume d'infarct chez des souris ischémiées. Pour cela, des ischémies ont été induites chez des souris par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, et les volumes d'infarct ont été déterminés, puis comparés.

Protocole : Les animaux (souris mâle C57/Blc âgées de 9 à 12 semaines, Genpharm, Danemark ; homozygotes type sauvage ou  $\Delta p53$ ) ont été anesthésiés dans un mélange d'oxygène, de protoxyde d'azote et de 1,8 % d'halothane, et maintenus dans ces conditions pendant toute la durée de l'intervention chirurgicale. La température rectale est maintenue à 37°C +/- 0,5 par une couverture chauffante. L'artère cérébrale moyenne gauche a ensuite été cautérisée par électrocoagulation au moyen d'une pince bipolaire. La plaie a ensuite été recousue et les animaux placés dans une pièce à 30°C pendant 24 heures, avec nourriture et boisson ad libitum. Au bout de 24 heures, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été prélevés, immergés dans un bain d'isopentane à -30°C, puis conservés à -80°C. Des coupes histologiques de 40  $\mu$ m ont ensuite été effectuées dans un cryostat à -20°C, à raison d'une coupe tous les 500  $\mu$ m, de l'apparition de l'infarctus jusqu'à sa disparition. Ces coupes ont

ensuite été colorées au violet de Crésyl. Le volume de l'infarctus est déterminé par analyse d'image. L'analyse statistique est faite à l'aide du test t de Student pour groupes indépendants, après vérification de l'homogénéité des variances. Dans le cas où les variances n'étaient pas homogènes, le test non paramétriques de Wilcoxon a été utilisé.

Résultats : Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau ci après.

	Souris P53	Souris Témoin
Nombre total d'animaux testés	45	46
Poids moyen (g)	25,73	25,44
Température moyenne (°C)	36,80	37,01
Volume moyen d'infarct (mm <sup>3</sup> )	24,95 +/- 1,81	31,54 +/- 1,86

Ces résultats font apparaître une diminution de l'ordre de 20 % des volumes d'infarct après ischémie des souris n'exprimant pas le gène p53. Ces résultats démontrent donc qu'une suppression de l'activité p53 permet de ralentir la dégénérescence neuronale.

Exemple 2 : Inhibition de la mort cellulaire induite par le glutamate sur des cultures primaires de neurones corticaux par un acide nucléique antisens anti-p53

Cet exemple décrit l'effet d'un acide nucléique antisens anti p53 sur la mort induite par le glutamate sur des neurones corticaux de rat embryonnaire, en culture primaire.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Cependant, une exposition au glutamate pendant des périodes anormalement longues, ou à des concentrations plus élevées que les concentrations physiologiques peut provoquer une toxicité neuronale désignée sous le terme d'excitotoxicité [Olnéy Adv. Exp. Med. Biol. 203 (1986) 631]. De nombreux arguments expérimentaux suggèrent que ce type de toxicité contribue à la

dégénérescence neuronale associée à l'ischémie, l'hypoxie, l'hypoglycémie, les attaques épileptiques ou encore aux trauma cérébraux [Choi, J. Neurobiol. 23 (1992) 1261]. L'excitotoxicité serait également impliquée dans la pathogénèse de maladies telles que la chorée de Huntington [Young et al., Science 241 (1988) 981] et la maladie d'Alzheimer [Koh et al., Brain Res. 533 (1990) 315 ; Mattson et al. ; J. Neurosci. 12 (1992) 376]. Cet exemple montre que l'effet toxique du glutamate est inhibé en partie en présence d'un acide nucléique antisens capable de réduire les niveaux d'expression de la protéine p53.

Préparation et séquence de l'acide nucléique antisens : L'oligonucléotide antisens a été synthétisé au moyen d'un synthétiseur automatique de nucléotides (Maniatis). La séquence de l'oligonucléotide est la suivante : 5'-CGACTGTGAATCCTCCAT-3' (SEQ ID n° 1).

Etude de l'inhibition : Les cellules de cortex de rat Wistar embryonnaire (E17) ont été isolées selon la méthode de Dichter [Brain Res. 149 (1978) 279], mises en culture sur boîtes 6 puits (35 mm ; densité  $6.10^5$  cellules/boîte) Costar, dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10 µg/ml insuline, 10 µg/ml transferrine, 10 ng/ml selenite de sodium, 10 nM progestérone, 1 nM triiodothyronine, et conservées dans une étuve (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). 2 µM d'acide nucléique antisens anti-p53 décrit ci-dessus ont ensuite été ajoutés aux cultures, lors de l'ensemencement, puis aux jours 1 et 2. Le glutamate (5 mM) a été administré au jour 2, en même temps que l'acide nucléique antisens anti-p53. La toxicité induite par le glutamate a été déterminée après 24 heures de culture, par mesure de l'activité mitochondriale selon la technique décrite par Manthorpe et al. [Dev. Brain. Res. 25 (1986) 191].

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1. Ils montrent clairement que l'acide nucléique antisens anti-p53 est capable de réduire d'environ 25 % la toxicité induite par le glutamate.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Compositions pharmaceutiques et leur utilisation, notamment pour le traitement des maladies neurodegeneratives.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CGACTGTGAA TCCTCCAT

18

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGACATGCCC GGGCATGTCC

20

### REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé inhibant au moins partiellement l'activité de la protéine p53 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.
- 5        2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un composé agissant sur la synthèse de la protéine p53, aux niveaux transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel, et/ou sur la liaison de p53 à l'ADN.
- 10       3. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique double brin comprenant tout ou partie du site de liaison de p53 à l'ADN.
4. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique codant pour une forme mutée de la protéine p53 capable d'antagoniser l'activité de celle-ci.
- 15       5. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique antisens capable de réduire les niveaux d'expression de la protéine p53, au niveau transcriptionnel ou traductionnel.
6. Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que l'acide nucléique antisens est un ADN codant pour un acide ribonucléique antisens capable d'inhiber la traduction de l'ARNm cellulaire de p53.
- 20       7. Utilisation selon les revendications 3 à 5 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur.
8. Utilisation selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur viral.
- 25       9. Virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, au moins un acide nucléique codant pour une forme mutée de la protéine p53 capable d'antagoniser l'activité de celle-ci, et/ou un acide nucléique comprenant tout ou partie du site de liaison de p53 à l'ADN et/ou un acide nucléique antisens capable de réduire les niveaux d'expression de la protéine p53, au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

10. Virus recombinant selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus adéno-associé, ou du virus de l'herpès.

11. Virus recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus.

5 12. Virus recombinant selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou de variants actifs de celle-ci.

10 13. Virus recombinant selon l'une des revendications 9 à 12 caractérisé en ce qu'il comprend plusieurs acides nucléiques identiques ou différents, tels que définis dans les revendications 3 à 5.

14. Virus recombinant selon l'une des revendications 9 à 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus défectif.

15. Composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant selon l'une des revendications 9 à 14.

1/1

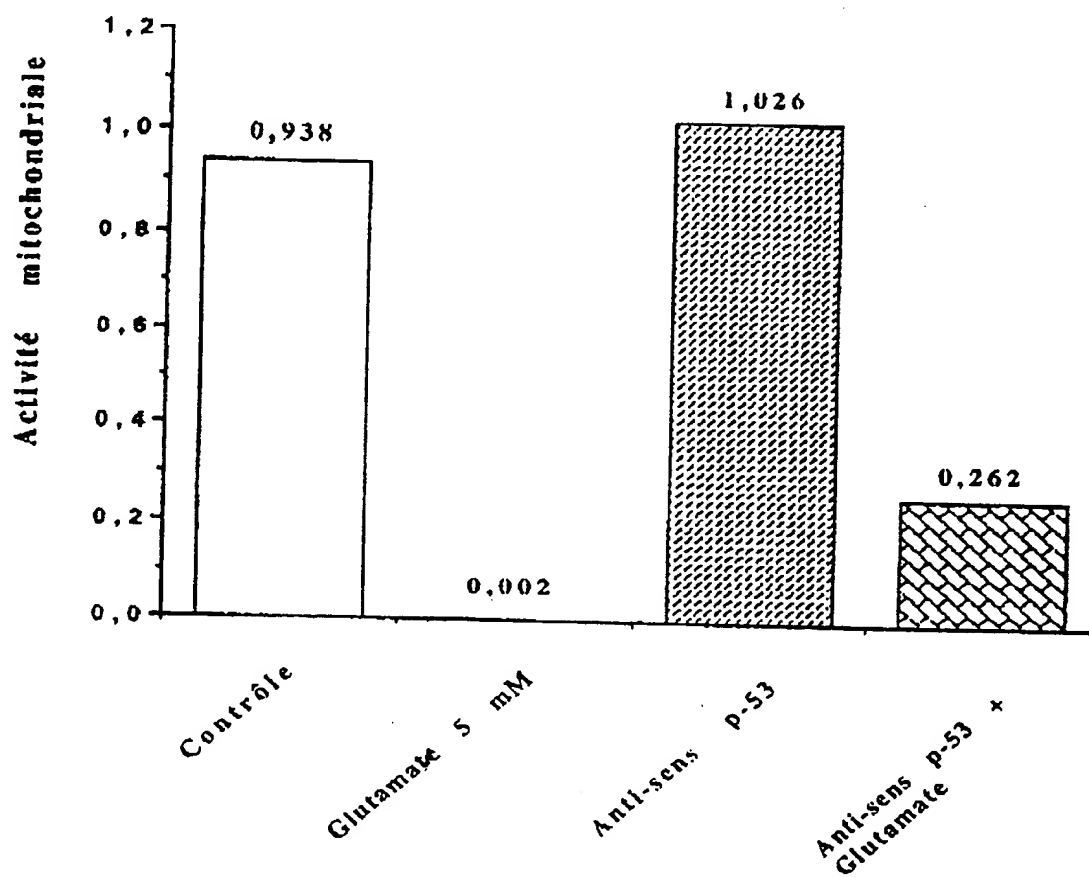


FIGURE 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 94/01142

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C07K14/82 A61K31/70 C12N7/01 //C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 05272 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2 April 1992 see page 5, line 21 - page 6, line 10	1,2,5
Y	see page 8, line 12 - line 34; claims	1-3, 7-11,14, 15
Y	--- WO,A,91 18088 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 28 November 1991 cited in the application see page 6, line 15 - line 35 see claims; example 1	7-11,14, 15
Y	--- WO,A,92 19732 (GENSET) 12 November 1992 see page 6, line 31 - page 7, line 16 see page 54, line 22 - page 56 see claims --- -/--	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 January 1995

Date of mailing of the international search report

20.01.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna

cation No

PCT/FR 94/01142

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.90, no.8, 15 April 1993, WASHINGTON US pages 3319 - 3323 FRIEDMAN, P. ET AL. 'The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA' cited in the application see the whole document ---	1-3,7,8
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.45, no.1, January 1991, NEW YORK, USA pages 22 - 29 MICHALOVITZ, D. ET AL. 'p53 mutations: gains or losses ?' cited in the application * page 25, 'Negative mutations and positive mutations' * ---	1,2,4
X	SCIENCE, vol.252, 21 June 1991, LANCASTER, PA US pages 1708 - 1711 KERN, S. ET AL. 'Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein' cited in the application see figure 3 -----	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/01142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9205272	02-04-92	CA-A- 2091759	18-03-92
		EP-A- 0556231	25-08-93
		JP-T- 6501160	10-02-94
		US-A- 5324654	28-06-94
-----			
WO-A-9118088	28-11-91	AU-A- 7906691	10-12-91
-----			
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94
		JP-T- 6506834	04-08-94
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 94/01142

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/11 C07K14/82 A61K31/70 C12N7/01 //C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,92 05272 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2 Avril 1992 voir page 5, ligne 21 - page 6, ligne 10	1,2,5
Y	voir page 8, ligne 12 - ligne 34; revendications	1-3, 7-11,14, 15
Y	--- WO,A,91 18088 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 28 Novembre 1991 cité dans la demande voir page 6, ligne 15 - ligne 35 voir revendications; exemple 1	7-11,14, 15
Y	--- WO,A,92 19732 (GENSET) 12 Novembre 1992 voir page 6, ligne 31 - page 7, ligne 16 voir page 54, ligne 22 - page 56 voir revendications	1-3
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 Janvier 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20.01.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.90, no.8, 15 Avril 1993, WASHINGTON US pages 3319 - 3323 FRIEDMAN, P. ET AL. 'The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-3,7,8
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.45, no.1, Janvier 1991, NEW YORK, USA pages 22 - 29 MICHALOVITZ, D. ET AL. 'p53 mutations: gains or losses ?' cité dans la demande * page 25, 'Negative mutations and positive mutations' * ---	1,2,4
X	SCIENCE, vol.252, 21 Juin 1991, LANCASTER, PA US pages 1708 - 1711 KERN, S. ET AL. 'Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein' cité dans la demande voir figure 3 -----	1-3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux numéros de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 94/01142

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9205272	02-04-92	CA-A- 2091759	18-03-92
		EP-A- 0556231	25-08-93
		JP-T- 6501160	10-02-94
		US-A- 5324654	28-06-94
WO-A-9118088	28-11-91	AU-A- 7906691	10-12-91
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94
		JP-T- 6506834	04-08-94